

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/39	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/20008 (43) Date de publication internationale: 4 juillet 1996 (04.07.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE95/00119 (22) Date de dépôt international: 21 décembre 1995 (21.12.95) (30) Données relatives à la priorité: 9401174 27 décembre 1994 (27.12.94) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOLVAY (SOCIÉTÉ ANONYME) [BE/BE]; Rue du Prince Albert 33, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): HILGERS, Luuk [NL/NL]; Mauritsstraat 15, NL-3583 HE Utrecht (NL). (74) Mandataires: MEYERS, Liliane etc.; Solvay (Société Anonyme), Dépt. de la Propriété Industrielle, 310, rue de Ransbeck, B-1120 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Titre: VACCINE ADJUVANTS (54) Titre: ADJUVANTS POUR VACCINS (57) Abstract <p>Vaccine adjuvants comprising a sulpholipid polysaccharide in combination with an interface-forming constituent. The invention also provides a method for preparing a vaccine by emulsifying an aqueous solution of an antigen and a sulpholipid polysaccharide. The adjuvants are stable at high temperatures, and are at least as effective as conventional adjuvants. Their local toxicity, i.e. their reactogenicity, is generally lower than that of conventional adjuvants.</p> (57) Abrégé <p>Adjuvants pour vaccins comprenant un polysaccharide sulfo-lipidique combiné à un composant formant une interface. On propose également un procédé pour préparer un vaccin en émulsionnant une solution aqueuse d'un antigène et un polysaccharide sulfo-lipidique. Les adjuvants proposés sont stables à haute température, leur efficacité est comparable ou même supérieure à celle des adjuvants classiques. Leur toxicité locale, c'est-à-dire leur réactogénicité est, en général, inférieure à celle des adjuvants classiques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Adjuvants pour vaccins

La présente invention a pour objet de nouveaux adjuvants pour vaccins.

Un antigène est défini comme étant une substance étrangère à un organisme vivant, qui lorsqu'on l'administre, par exemple, par voie parentérale induit une réponse immunitaire, par exemple, la formation
5 d'anticorps.

Les anticorps sont des substances contenues dans le sang et autres fluides du corps, ainsi que dans les tissus, qui se lient à l'antigène pour le rendre inoffensif. Les anticorps constituent un des mécanismes naturels de défense du corps. Ils sont hautement spécifiques et peuvent tuer, lier ou
10 rendre inoffensif l'antigène qui a induit leur formation.

L'antigène, en contact avec le système immunitaire, active donc une série complexe d'interactions cellulaires dont le but est d'éliminer l'antigène et/ou de rétablir l'équilibre précédent.

Deux des aspects caractéristiques des antigènes sont leur immunogénicité, c'est-à-dire leur capacité d'induire une réponse immunitaire in vivo (entre autres la formation d'anticorps spécifiques) et leur antigénicité, c'est-à-dire leur capacité d'être reconnu sélectivement par les anticorps dont les
15 antigènes sont à l'origine.

Il est connu de stimuler la réponse immunitaire délibérément en administrant un antigène spécifique au moyen d'un vaccin. Cette procédure permet d'obtenir un état de mémoire immunitaire dans l'organisme qui permet une réponse plus rapide et plus efficace de l'organisme lors d'un contact ultérieur avec l'antigène.
20

Cependant, quelques antigènes ne possèdent qu'une faible immunogénicité et induisent une réponse immunologique insuffisante pour procurer à l'organisme une protection efficace.
25

L'immunogénicité d'un antigène peut être augmentée en l'administrant ensemble avec des substances, appelées adjuvants, qui augmentent la réponse contre l'antigène soit en agissant directement sur le système immunitaire soit en modifiant les caractéristiques pharmacocinétiques de
30 l'antigène et en augmentant ainsi le temps d'interaction avec le système immunitaire.

A présent, un grand nombre de vaccins vétérinaires utilisés en tant qu'adjuvants comprennent encore les émulsions classiques d'huile minérale, tels que l'adjuvant de type eau dans huile minérale (w/o) ou de type huile minérale dans eau (o/w). Depuis plusieurs années, des recherches ont été
5 entreprises pour trouver des alternatives ayant une efficacité similaire mais une toxicité réduite. Les injections de ces adjuvants classiques à base d'huile minérale sont souvent accompagnées par des réactions locales dont la sévérité dépend largement du type d'émulsion et de la nature de l'huile utilisée. L'utilisation d'adjuvants à base d'huile minérale est par conséquent
10 limitée aux animaux domestiques (porcs, poules, ruminants, etc.) et aux animaux de laboratoire.

Précédemment, il a été montré qu'un copolymère synthétique de polysucrose et épichloridrine - le Ficoll - portant des groupes sulfate et lipides (SL-Ficoll), incorporé dans une émulsion de squalane (S) dans de
15 l'eau (S/W) exerçait un effet adjuvant élevé sur différentes espèces d'animaux - dont des porcs - contre différents types d'antigènes, y compris quelques antigènes viraux importants [Vaccine 12, p. 653-660 (1994) et Vaccine 12, p. 661-665 (1994), EPO 0 549 074]. Ces formulations d'adjuvants à base de Ficoll sont assez efficaces pour remplacer les
20 formulations classiques d'huile minérale dans l'eau utilisées dans différents vaccins porcins.

Cependant la toxicité locale, c'est-à-dire la réactogénicité, de ces formulations à base de Ficoll sur des porcs et des souris ne s'est pas révélée plus faible que celle des formulations classiques d'huile minérale de type
25 o/w.

De plus, pour les formulations à base de Ficoll, la température a un effet prononcé sur la stabilité des émulsions. Certaines de ces émulsions ont été stables pendant des années à 4 °C mais la phase aqueuse et la phase d'huile se séparent endéans quelques jours à 37° C et endéans une dizaine
30 de minutes à 60 °C.

Le but de la présente invention est de proposer un adjuvant efficace pour vaccins ayant une stabilité accrue à haute température et révélant une toxicité locale plus faible.

Ce but est atteint par un adjuvant pour vaccins comprenant un
35 polysaccharide sulfo-lipidique combiné à un composant formant une interface [p. ex., une émulsion de type huile/eau (o/w)].

Un des avantages de l'adjuvant selon la présente invention est qu'il est plus stable à haute température que les adjuvants à base de Ficoll.

Ce but est atteint par un adjuvant pour vaccins comprenant un polysaccharide sulfo-lipidique combiné à un composant formant une interface.

L'expression "polysaccharide" signifie un composé ayant au moins trois unités sucres répétitives reliées l'une à l'autre de manière covalente.

L'expression "polysaccharide sulfo-lipidique" signifie un composé ayant au moins trois unités sucres répétitives reliées l'une à l'autre de manière covalente, au moins un groupe de sulfate et au moins un groupe lipidique.

De préférence, le polysaccharide sulfo-lipidique est un polysaccharide hydrophobe.

L'expression "polysaccharide hydrophobe" signifie un polysaccharide qui est moins soluble dans une phase aqueuse que dans une phase organique apolaire.

Selon un premier mode de réalisation avantageux, le polysaccharide sulfo-lipidique est choisi parmi le groupe constitué de cyclodextrine, maltodextrine, inuline, ficoll et pullulane.

De préférence, le polysaccharide sulfo-lipidique est choisi parmi le groupe constitué de cyclodextrine, maltodextrine et inuline.

Le polysaccharide sulfo-lipidique préféré est la cyclodextrine.

Le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 0,01 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe. De préférence, le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 0,12 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

Le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 1,0 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe. De préférence, le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 0,23 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de la maltodextrine, celui-ci contient en moyenne environ 0,23 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de la cyclodextrine, celui-ci contient en moyenne environ 0,20 groupe sulfate par

monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de l'inuline, celui-ci contient en moyenne environ 0,19 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

5 De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est du pullulane, celui-ci contient en moyenne environ 0,16 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est du ficoll, celui-ci contient en moyenne environ 0,12 groupes sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

10 Le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 0,01 groupe lipidique par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe. De préférence, le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 1,05 groupe lipidique par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

15 Le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 2,0 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe. De préférence, le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 1,29 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

20 De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de la maltodextrine, celui-ci contient en moyenne environ 1,29 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de la cyclodextrine, celui-ci contient en moyenne environ 1,05 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

25 De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de l'inuline, celui-ci contient en moyenne environ 1,24 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

30 De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est du pullulane, celui-ci contient en moyenne environ 1,24 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est du ficoll, celui-ci contient en moyenne environ 1,22 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

35 Les groupes lipidiques contiennent, de préférence, entre 4 et 22 atomes

de carbone.

Le rapport des groupes sulfates et lipidiques est avantageusement compris entre 0,01 et 2 groupes sulfates par groupe lipidique. De préférence, le rapport des groupes sulfates et lipidiques est compris entre 0,10 et 0,19 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant le caractère hydrophobe du composé.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de la maltodextrine, le rapport des groupes sulfates et lipidiques est d'environ 0,18 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de la cyclodextrine, le rapport des groupes sulfates et lipidiques est d'environ 0,19 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est de l'inuline, le rapport des groupes sulfates et lipidiques est d'environ 0,15 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est du pullulane, le rapport des groupes sulfates et lipidiques est d'environ 0,13 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

De préférence, quand le polysaccharide sulfo-lipidique est du ficoll, le rapport des groupes sulfates et lipidiques est d'environ 0,10 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

L'expression "composant formant une interface" ("Interface-Forming Constituent" ou "IFC") signifie une substance qui forme, dans un milieu aqueuse, une interface physique entre la substance et la phase aqueux.

Le composant formant une interface est choisi parmi le groupe constitué d'un liquide non miscible à l'eau (par exemples : squalane, huile de soja, huile minérale, hexadécane), ou un solide insoluble dans la phase aqueuse.

Les solides insoluble dans la phase aqueuse de la présente invention comprennent des sels insolubles (p. ex. $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , Alun, oxalate de calcium), des microparticules, des nanoparticules, des microsphères et des nanosphères d'un ou des multiples polymères, copolymères (p.ex. polyacrylate, poly(methyl methacrylate), polycyanoacrylate, polylactide, polyglycolide). ou des bi-couches lipidiques ou des agents lipophiles (p.ex., phospholipides) ou des micelles d'agents tension-actifs.

De préférence, le composant "IFC" est un liquide non miscible à l'eau.

Avantageusement, le composant formant une interface est choisi parmi le groupe constitué d'huile de soja, de squalane et hexadécane.

5 Les adjuvant stables pour vaccins sont ceux qui comprennent un dérivé (hydrophobe) d'un polysaccharide sulfo-lipidique, un composant formant une interface et un agent émulsifiant.

De plus, l'efficacité des adjuvants selon la présente invention est comparable ou même supérieure à celle des adjuvants classiques. La toxicité locale, c'est-à-dire la réactogénicité des adjuvants selon la présente invention est, en général, inférieure à celle des adjuvants classiques et à celle des adjuvants à base de ficoll.

Il semblerait que les polysaccharide sulfo-lipidique à poids moléculaires relativement plus faibles aient une moindre toxicité locale.

15 Selon un autre aspect de la présente invention, on propose l'utilisation du polysaccharide sulfo-lipidique en tant qu'adjuvant dans des vaccins.

Selon encore un autre aspect de la présente invention, on propose un procédé pour préparer un vaccin en émulsion caractérisé en ce que l'on émulsionne une solution aqueuse d'un antigène en présence d'un polysaccharide sulfo-lipidique, d'un émulsifiant et un composant formant une interface.

20 Selon un autre aspect de la présente invention, on propose un vaccin comprenant une quantité immunogénique d'un antigène (immunogène) et un adjuvant selon la présente invention.

De préférence, la concentration d'adjuvants est comprise entre 0.1 et 100 mg/ml, de préférence entre 2 et 20 mg/ml.

25 Le vaccin comprend, outre l'adjuvant, des antigènes par exemple de virus inactivé, de virus vivant, de bactérie, de sous-unité, de protéine, de peptide et de virus influenza inactivé souche MRC-11, d'ovalbumine (OVA), de virus influenza inactivé souche A/Swine et/ou de virus de pseudorabies inactivés (iPRV).

30 Les titres en anticorps mesurés ont été plus élevés que ceux obtenus par les émulsions d'huile minérale dans de l'eau utilisées dans des produits commerciaux. Il a été montré qu'il existe une forte activité synergique entre les SL-Ficoll et les émulsions, plus prononcée sur les porcs que sur les souris (Hilgers et al. Vaccine 12, 661-664. 1994). La réponse d'anticorps sur les souris a été augmentée d'une manière significative (Hilgers et al.

Vaccine 12, 653-660, 1994).

On a conclu que la réactogénicité dépend du type de polysaccharide et d'huile inclus dans les formulations et que le poids moléculaire du polysaccharide est un des facteurs importants.

5 Les Cyclodextrines et leurs dérivés sont bien connus pour être capables de former des complexes d'inclusion en abritant d'autres substances, comme p.ex. des substances d'intérêt pharmaceutique, dans la cavité formée par leur structure cyclique.

10 Parmi les avantages offerts par ces complexes d'inclusion, on peut citer l'amélioration de la solubilité, de la biodisponibilité et/ou de la stabilité chimique, l'allongement du temps de demi-vie, la diminution des effets secondaires ainsi que certains avantages lors de la production tels que une obtention plus aisée de poudre sèche au départ de préparations liquides.

15 Les Polysaccharides Sulfo-Lipidique (SLP) à base de Cyclodextrine peuvent dès lors avoir des applications intéressantes en plus de leur utilisation comme adjuvant décrite ci-dessus.

20 En effet, les SL-Cyclodextrines sont des agents tensio-actifs par suite de la présence simultanée dans ces molécules de groupes anioniques (sulfates) et hydrophobes (chaînes aliphatiques). Cette propriété est à l'origine de la formation de micelles en phase aqueuse ou de micelles mixtes en présence d'autres substances tensio-actives, ainsi que de la formation d'émulsions de liquides non miscibles dans l'eau, de suspensions en phase aqueuse de particules insolubles ou de la formation d'interfaces entre phase aqueuse et matière insoluble liquide ou solide.

25 Ainsi, les SL-Cyclodextrines présentent le double avantage de pouvoir former des complexes d'inclusion et d'être des substances tensio-actives.

Elles peuvent donc être considérées comme formant une famille de produits présentant des propriétés nouvelles susceptibles d'applications originales dans le secteur pharmaceutique.

30 De nombreuses SL-Cyclodextrines différentes ont été obtenues; elles se distinguent par leurs propriétés physico-chimiques résultant du type de Cyclodextrine (p.ex. α , β , γ) de la teneur en groupes sulfates ainsi que de la teneur et de la nature des groupes lipidiques.

Exemple 1

35 Différents polysaccharides ont été testés pour leur solubilité dans les solvants organiques utilisés pour la synthèse et ceux insuffisamment solubles

ont été abandonnés. 4,5 grammes de la maltodextrine (Maltodextrine15; Amylum, Belgium), 4,5 grammes de la bêta-cyclodextrine (ACROS), 4,5 grammes de l'inuline (Dahlia Tubers; Sigma, U.S.A.) et 4,5 grammes du pullulane (Hayashibara Co. Ltd. Japon) ont été solubilisés séparément dans des mélanges (100 ml) de diméthylformamide anhydre et de pyridine anhydre (rapport volumique 1:1). Pendant une courte période de temps (48 heures), les solutions de ces polysaccharides ont été séchées à l'aide de tamis moléculaires (size 2Å) (Merck, Darmstadt, Allemagne). 6,6 grammes du chlorure de lauroyle (Merck, Germany) a été ajouté et les mélanges ont été incubés pendant 6 heures à 60 °C et pendant 18 heures à température ambiante (environ 15 °C - 22 °C). Ensuite, 0,6 grammes de l'acide chlorosulfonique (Merck, Germany) dans un mélange (10 ml) de diméthylformamide anhydre et de pyridine anhydre a été ajouté et la procédure d'incubation à température ambiante a été renouvelée. Les solvants ont été éliminés par évaporation à pression réduite (200 millibars) pour 1-2 heures à 60 °C et dialysés en utilisant une membrane de cellulose régénérée ayant un seuil de coupure de 10.000 Daltons (SPECTRA/POR) en mettant en oeuvre une solution saline tamponnée de phosphate isotonique (cette solution saline PBS comprend, par litre d'eau, 8 g de chlorure de sodium, 0,2 g de chlorure de potassium et 1,15 g de phosphate hydrogéné disodique ayant un pH de 7,3) et postérieurement en mettant en oeuvre de l'eau ultrapure jusqu'à ce qu'aucune trace de solvant ne soit détectée dans le filtrat. Le rapport volumique entre la solution de dialyse (solution saline PBS ou eau ultrapure) et le reliquat utilisé au cours de la dialyse est maintenu au dessus de 10:1 (v/v). La dialyse est réalisée durant au moins 10 jours, la solution de dialyse étant remplacée au moins une fois par jour. Les polysaccharides sulfo-lipidiques (SLP) ainsi obtenus ont été lyophilisés à température ambiante, avec une pression interne inférieure à 0,1 mbar et un piège à froid ayant une température inférieure à -25 °C.

La composition des SLP a été déterminée en dosant le polysaccharide, les sulfates liés, le contenu total en lipides et le contenu en lipides liés tel que décrit précédemment (Vaccine 12, p. 653-660).

Des solutions de 1 % poids/volume (p/v) de SLP dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) contenant 2 % volume/volume (v/v) de Tween 80 ont été préparées en dissolvant d'abord les SLP dans un volume minimal (20 ml) de méthyltertio-butyléther (Merck), en ajoutant 2

ml de Tween 80 (Merck) par g de SLP et en évaporant le méthyltertio-butyléther à température élevée ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) et à pression réduite (50 millibars) jusqu'à ce qu'une solution visqueuse de SLP dans du Tween 80 ait été obtenue. Dix ml d'eau par g de SLP ont été ajoutés lentement et ensuite les volumes appropriés de PBS et d'huile ont été ajoutés. Le mélange a été émulsifié en utilisant un microfluidiseur (Microfluidics Corp., Newton, U.S.A) jusqu'à ce que plus aucune goutte d'huile supérieure à 2 ou 3 μm ne soit visible sous le microscope (agrandissement de 1000 fois). Les émulsions ont été stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les vaccins ont été préparés en mélangeant un volume d'antigène avec un volume d'adjuvant. Les antigènes ont été préparés tel que décrit précédemment (Vaccine 12, p. 653-660 et Vaccine 12, p. 661-665). Deux solutions d'antigènes différentes ont été utilisées : la solution I comprend par ml : 10 μg de virus influenza inactivé souche MRC-11 (SOLVAY DUPHAR) + 1000 μg OVA (SIGMA) et la solution II comprend par ml : 4,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de virus influenza inactivé souche A/Swine (SOLVAY DUPHAR), 4,0 μg de virus influenza inactivé de la souche MRC-11 (SOLVAY DUPHAR), 2,0 μg de virus influenza inactivé de la souche X-79 (SOLVAY DUPHAR), et 10^8 TCID₅₀ de virus de pseudorabies inactivés (iPRV) (SOLVAY DUPHAR).

Des souris femelles NMRI (Charles River, Germany) de 8 à 10 semaines (environ 20 g) ont été immunisées par injection dans la patte avec 0,025 ml de vaccin et les titres en anticorps ont été mesurés trois semaines plus tard.

Les titres en anticorps ont été exprimés en tant que moyennes géométriques ($2^{\log} + \text{SEM}$). L'analyse des titres d'anticorps a été effectuée par des tests standardisés et les critères pour la validité ont été décrits précédemment (Vaccine 12, p. 653-660).

Des tests de Student ont été effectués pour analyser la signification statistique des résultats et une $P < 0,05$ a été considérée comme étant significative.

Des formulations d'adjuvants ont été testées dans deux expériences indépendantes sur des souris.

Tableau 1 : L'effet adjuvant de certaines émulsions à base de polysaccharides sulfo-lipidiques (SLP) dans de l'huile et de l'eau (SLP/o/w) sur des souris.

- 10 -

Adjuvant [mg SLP et μ l huile]/ml	n	2_{\log} du titre d'anticorps contre			
		MRC 11		OVA	
		moyenne	SEM	moyenne	SEM
Expérience I					
SL-Maldex15/S/W [10/100]	6	13.1	0.7	7.3	0.2
SL-Cyclodex./S/W [10/100]	6	12.9	1.0	7.2	0.6
SL-Inuline/S/W [10/100]	6	12.7	0.8	7.2	0.2
SL-Pullulane/S/W [10/100]	6	13.3	0.7	6.9	0.4
SL-Maldex15/soja/W [10/100]	6	12.8	0.6	6.5	0.7
SL-Cyclodex./soja/W [10/100]	6	13.6	1.1	6.0	0.8
SL-Inuline/soja/W [10/100]	6	12.5	0.6	6.8	1.3
SL-Pullulane/soja/W [10/100]	6	12.5	0.8	6.6	0.4
SL-Ficoll/S/W [10/100]	6	13.0	0.9	6.9	0.4
SL-Ficoll/soja/W [10/100]	6	12.0	0.6	6.6	0.3
SL-Ficoll/hexadéc./W [10/100]	4	12.4	0.9	7.2	0.6
SL-Ficoll/h. minérale/W [10/100]	4	12.2	0.5	6.8	0.3
Contrôle (sans adjuvant)	6	11.3	0.7	3.5	2.0
Expérience II					
SL-Maldex15/S/W [10/100]	6	13.3	0.8	9.0	1.1
SL-Cyclodex./S/W [10/100]	6	13.0	0.6	8.6	0.8
SL-Inuline/S/W [10/100]	6	12.8	0.9	8.6	0.8
SL-Pullulane/S/W [10/100]	6	13.6	0.5	8.8	0.8
SL-Maldex15/soja/W [10/100]	6	11.2	0.7	7.4	0.3
SL-Cyclodex./soja/W [10/100]	6	11.7	0.5	6.5	1.0
SL-Inuline/soja/W [10/100]	6	11.8	0.5	7.5	0.4
SL-Pullulane/soja/W [10/100]	6	10.9	0.8	7.3	0.4

SL-Maldex15/hexadéc./W [10/100]	6	12.2	0.7	8.3	0.8
SL-Cyclodex./hexadéc/W [10/100]	6	12.5	0.6	8.2	0.6
SL-Inuline/hexadéc./W [10/100]	6	12.2	0.4	7.4	0.4
SL-Pullulane/hexadéc/W [10/100]	6	13.2	0.4	7.7	0.2
Contrôle (sans adjuvant)	6	10.0	0.4	4.2	0.9
SL-Ficoll/S/W [10/100]	2	13.4	0.7	8.5	0.7

n = nombre d'animaux

SEM = déviation standard de la moyenne

Maldex15 = maltodextrine15

Cyclodex. = cyclodextrine

W = eau (water)

soja = huile de soja

hexadéc. = hexadécane

h. minérale = huile minérale

S = squalane

5
10
15
Toutes les émulsions SLP/huile/eau ont augmenté la réponse humorale contre le virus de l'influenza souche MRC-11 et contre OVA. Il a été montré qu'il existe des différences en effet adjuvant entre les différentes formulations et quelques-unes ont provoqué des activités égales au SL-Ficoll/S/W. Aucun effet clair dû au type de SLP n'a pu être observé. En ce qui concerne le type d'huile utilisé, des émulsions comprenant du squalane (S) ont donné des réponses significativement plus élevées que les émulsions contenant de l'hexadécane tandis que l'huile de soja provoquait les réponses les moins élevées.

Exemple 2

Des porcs de 8 à 10 semaines d'âge ont été testés pour constater une éventuelle présence d'anticorps contre les antigènes viraux en question et les animaux avec des titres d'anticorps détectables ont été exclus.

20 Une émulsion minérale huile dans l'eau vendue sous la marque SUVAXYN O/W EMULSION (SOLVAY DUPHAR) ainsi que des formulations de SLP dans une émulsion de squalane dans l'eau ont été préparées selon la méthode décrite à l'exemple 1.

Des vaccins contenant les formulations avec adjuvant ont été préparés selon la méthode décrite à l'exemple 1.

25 Des formulations de SLP/squalane/eau ont été testées pour leur effet adjuvant sur des porcs avec l'iPRV et le Virus Influenza Inactivé - souches MRC-11 et A/Swine, en tant qu'antigènes (Tableau 2). Les animaux ont été

- 12 -

immunisés deux fois (semaines 0 et 3) et les titres en anticorps ont été mesurés trois semaines (semaine 6) après la deuxième injection.

- Les titres en anticorps contre PRV (anti-PRV) ont été augmentés par les émulsions SL-Ficoll/squalane/eau, SL-Maltodextrine15/squalane/eau, SL-Inuline/squalane/eau et SL-Cyclodextrine/squalane/eau. Les titres en anticorps mesurés ont été comparables ou plus élevés que ceux obtenus par les émulsions d'huile minérale dans de l'eau utilisées dans des produits commerciaux. La réponse d'anticorps contre A/Swine a aussi été augmentée par différentes formulations SLP/squalane/eau mais certaines réponses ont été aussi élevées que celles obtenues par les émulsions huile/eau classiques. Les titres en anticorps contre MRC-11 ont été augmentés par différentes formulations et quelques émulsions SLP/squalane/eau ont montré des titres comparables ou plus élevés que les émulsions huile minérale/eau.

Les résultats de ces analyses sont repris dans le tableau 2.

- Tableau 2 : Effets de différents polysaccharides sulfo-lipidiques combinés avec plusieurs émulsions d'huile dans de l'eau sur la réponse d'anticorps anti-iPRV/A/swine/MRC-11 mesurés sur des porcs.**

Adjuvant [mg SLP + μ l huile]/ml	² log des titres d'anticorps à 6 semaines					
	iPRV		A/Swine		MRC-11	
	moyen.	SEM	moyen.	SEM	moyen.	SEM
PBS	0.5	0.0	<3.3	0.0	<3.9	0.5
huile minérale/W [0/500]	6.5	0.4	10.7	1.3	10.7	0.9
SL-Ficoll/S/W [10/100]	7.8	0.8	11.5	2.9	>12.7	2.4
SL-Maldex15/S/W [10/100]	7.5	1.1	8.7	1.1	13.1	1.3
SL-Cyclodex./S/W [10/100]	9.0	1.1	10.1	1.5	>12.9	2.2
SL-Inuline/S/W [10/100]	8.9	1.3	10.3	1.0	>13.7	1.3

SEM = déviation standard de la moyenne S = squalane

Maldex15 = maltodextrine15

W = eau (water)

- Cyclodex. = cyclodextrine

A partir d'expériences précédentes pour tester l'effet adjuvant en parallèle sur ces deux espèces d'animaux, il a été montré qu'il existe une forte activité synergique entre les SL-Ficolls et les émulsions et qu'elle est

plus prononcée sur les porcs que sur les souris (Vaccine 12, 653-660, 1994; Vaccine 12, 661-664, 1994). La réponse d'anticorps sur les souris a été augmentée d'une manière significative et il a été montré qu'il existe un effet prononcé du type d'huile employé mais non pas du type de polysaccharide.

5 Le facteur d'augmentation en comparaison avec des animaux qui n'ont reçu que l'antigène a été limité à une ou deux unités 2_{\log} sur les souris. Sur les porcs, l'effet adjuvant a été plus prononcé principalement parce que la réponse contre les antigènes sans adjuvant a été très faible. Les titres en anticorps anti-iPRV et anti-A/wine et anti-MRC-11 ont été augmentés de
10 plus de six unités 2_{\log} .

Les adjuvants à base d'huile minérale augmentent la réponse d'anticorps d'une manière significative, mais différentes nouvelles formulations d'adjuvants ont provoqué des titres encore plus élevés. L'adjuvant SL-Ficoll/S/W présenté précédemment (Vaccine 12, p. 653-660 et Vaccine 12,
15 p. 661-665) s'est révélé plus efficace que l'huile minérale et tandis que certains nouveaux SLP ont exercé une activité égale ou supérieure aux SL-Ficoll.

Exemple 3

20 Outre l'effet adjuvant, d'autres propriétés sont importantes pour l'évaluation d'un vaccin. Entre autres, la réaction locale est un aspect important, bien qu'une certaine réaction à l'endroit d'injection soit acceptée en général pour certaines espèces d'animaux. La toxicité locale a été testée in vivo en suivant le gonflement des pattes de souris après injection du vaccin. Il a été montré que cette méthode est très sensible.

25 Des formulations de SLP dans une émulsion de squalane dans l'eau, d'huile de soja dans l'eau, d'huile minérale et d'hexadécane dans l'eau ainsi qu'un témoin sans adjuvant ont été préparés selon la méthode décrite à l'exemple 1.

30 Des vaccins contenant les formulations avec adjuvant ont été préparés selon la méthode décrite à l'exemple 1.

Des groupes de six souris ont été traités avec 25 μ l de vaccin par injection sous-cutanée dans la plante du pied arrière gauche. Le vaccin comprenait un volume de solution d'antigènes contenant 10 μ g de MRC-11 et 1 mg d'ovalbumine (OVA) par ml de PBS et un volume d'adjuvant.

35 L'épaisseur des pattes a été mesurée un jour avant et à plusieurs intervalles après l'injection par un appareil semi-électronique spécialement

- 14 -

développé pour ce propos par l'Université d'Etat d'Utrecht aux Pays-Bas.

La précision de cet appareil est d'environ 0,02 mm.

Le gonflement a été calculé en soustrayant l'épaisseur de la patte avant le traitement de l'épaisseur de la patte après le traitement et est exprimé en

5 0,01 mm.

Les résultats de ces expériences sont repris dans le tableau 3.

Tableau 3 : Réactogénicité de différents adjuvants sur des souris

Expérience I

Adjuvant [mg SLP+ μ l huile]/ml	gonflement moyen (10^{-2} mm)								
	Jours								
	1	2	3	4	7	11	14	18	25
SL-Maldex15/S/W [10/100]	169	110	89	65	39	16	18	19	17
SL-Cyclodex./S/W [10/100]	88	21	8	8	9	3	6	12	-1
SL-Inuline/S/W [10/100]	146	145	94	102	44	30	25	26	20
SL-Pullulane/S/W [10/100]	235	231	137	112	87	74	60	64	42
SL-Maldex15/soja/W [10/100]	30	10	5	0	2	10	5	5	1
SL-Cyclodex./soja/W [10/100]	2	0	0	0	0	0	4	10	-7
SL-Inuline/soja/W [10/100]	117	64	13	7	7	10	20	18	1
SL-Pullulane/soja/W [10/100]	40	23	7	0	0	0	3	10	-2
SL-Ficoll/S/W [10/100]	196	273	299	305	305	237	177	144	97
SL-Ficoll/soja/W [10/100]	124	59	24	20	26	17	12	7	-5
SL-Ficoll/hexadéc./W [10/100]	241	277	242	209	92	35	42	49	14
SL-Ficoll/h. minérale/W [10/100]	233	295	300	292	201	165	120	89	75
Contrôle (sans adjuvant)	2	0	0	0	0	0	4	-6	-4

Maldex15 = maltodextrine15

Cyclodex. = cyclodextrine

soja = huile de soja

W = eau (water)

hexadéc. = hexadécane

h. min. = huile minérale

S = squalane

Expérience II

Adjuvant [mg SLP+ μ l huile]/ml	gonflement moyen (10^{-2} mm)					
	Jours					
	1	2	6	10	17	22
SL-Maldex15/S/W [10/100]	133	95	61	30	35	24
SL-Cyclodex./S/W [10/100]	62	54	10	15	17	1
SL-Inuline/S/W [10/100]	176	134	71	51	55	48
SL-Pullulane/S/W [10/100]	200	199	91	94	77	46
SL-Maldex15/soja/W [10/100]	20	10	7	0	0	0
SL-Cyclodex./soja/W [10/100]	19	16	21	16	11	12
SL-Inuline/soja/W [10/100]	52	38	22	11	24	0
SL-Pullulane/soja/W [10/100]	52	38	11	4	15	0
SL-Maldex15/hexadène/W [10/100]	108	65	14	14	22	0
SL-Cyclodex./hexadéc./W [10/100]	107	74	14	10	25	0
SL-Inuline/hexadéc./W [10/100]	121	114	46	30	22	0
SL-Pullulane/hexadéc./W [10/100]	224	213	112	59	40	23
Contrôle (sans adjuvant)	2	0	0	0	0	0
SL-Ficoll/S/W [10/100]	73	293	325	239	178	99

Maldex15 = maltodextrine15
Cyclodex. = cyclodextrine

hexadéc. = hexadécane
soja = huile de soja

S = squalane W = eau

Les formulations ont provoqué différents degrés de gonflement au point d'injection, ce gonflement qui a été très fort dans certains cas pendant les premiers jours, s'estompait lentement (Tableau 3). Des émulsions comprenant de l'hexadécane ont provoqué, en général, des réactions plus fortes que celles contenant de l'huile de soja. En ce qui concerne les SLP, les émulsions de squalane comprenant du SL-Ficoll ont provoqué des gonflements plus forts qui se sont maintenus pendant plus de trois semaines. Les émulsions contenant du SL-Maltodextrine15, du SL-Inuline ou du SL-Pullulane provoquaient des réactions de gonflement considérables qui s'estompaient cependant plus rapidement que celles provoquées par le SL-Ficoll et ne persistaient que pendant une à deux semaines.

La réactogénicité du SL-Cyclodextrine inclus dans différentes huiles a été très faible ou même absente. Des émulsions contenant du SL-Cyclodextrine dans du squalane ou de l'hexadécane ont provoqué quelques gonflements pendant un ou deux jours après l'injection tandis que la SL-Cyclodextrine dans de l'huile de soja n'a pas provoqué de réponse visible.

La réactogénicité, c'est-à-dire la toxicité locale, testée sur les souris, montrait des effets prononcés en fonction du type d'huile et du type de polysaccharide. En général, le SL-Ficoll provoquait des réactions plus fortes que les autres SLP testés. Le SL-Ficoll combiné avec soit du squalane soit de l'huile minérale a provoqué une réaction locale très forte et persistante tandis que le SL-Ficoll combiné avec de l'hexadécane et de l'huile de soja n'a donné que des réactions modérées ou plus faibles respectivement (Tableau 2). Des émulsions à base de squalane ont provoqué des réactions significativement plus fortes que celles comprenant de l'hexadécane. L'huile de soja n'a provoqué que des réactions très faibles.

Le caractère hydrophobe de ces huiles est différent. Le squalane, l'huile minérale et l'hexadécane sont des hydrocarbures fortement hydrophobes, tandis que l'huile de soja, étant un mélange de différentes substances, est moins hydrophobe. Le caractère hydrophobe des différentes huiles est illustré par la valeur HLB des détergents nécessaires pour obtenir une émulsion stable dans de l'eau.

Le SL-Pullulane a provoqué des toxicités locales plus fortes que les trois autres SLP. SL-Inuline et SL-Maltodextrine15 ont provoqué des

gonflements locaux considérables tandis que le SL-Cyclodextrine n'a provoqué qu'une réaction notable seulement pendant un ou deux jours.

Parmi les autres caractéristiques, les SLP diffèrent dans leur poids moléculaire qui décroît de SL-Ficoll = à celle SL-Pullulane > SL-Inuline
5 > SL-Maltodextrine15 > SL-Cyclodextrine. Un parallélisme entre la réactogénicité et le poids moléculaire peut être observé mais d'autres recherches sont requises pour établir une relation directe.

On en a conclu que la réactogénicité dépend du type de polysaccharide et d'huile inclus dans les formulations et que le poids moléculaire du
10 polysaccharide est un facteur important.

Exemple 4

Des dérivés sulfo-lipidiques de Maltodextrine15, d'Inuline, de Cyclo-
dextrine et de Pullulane ont été synthétisés et incorporés dans des émulsions
d'huile dans de l'eau à base de squalane, d'huile minérale, d'hexadécane et
15 d'huile de soja et la stabilité a été étudiée in vitro.

Les SLP de la présente invention ont été synthétisés selon la méthode décrite à l'exemple 1 et mélangés dans des émulsions huile dans l'eau de squalane, hexadécane et huile de soja et la stabilité de celles-ci a été étudiée
in vitro.

20 Des formulations de SLP dans une émulsion de squalane dans l'eau, d'huile de soja dans l'eau et d'hexadécane dans l'eau ont été préparées selon la méthode décrite à l'exemple 1.

La stabilité des émulsions a été testée en exposant les formulations à température élevée pendant une certaine période de temps. En général, les
25 émulsions sont moins stables à haute température et le test à température élevée a été considéré comme donnant des indications sur le comportement à long terme à température plus faible.

La stabilité des émulsions a été déterminée à 37 °C. Des aliquotes stériles de 5 ml d'émulsion ont été incubés à 37 °C et la formation de
30 gouttelettes d'huile, l'apparition d'une phase huileuse et autres modifications ont été vérifiées chaque jour par inspection des émulsions à l'oeil nu.

Les SLP avec un rapport S/L d'environ 0,1/1,0 ont été incorporés dans des émulsions de type huile dans eau à base de squalane, de l'hexadécane et
d'huile de soja.

35 Des aliquotes stériles comprenant 0,01 % (p/v) de thimérosal (SIGMA) ont été incubés à 37 °C et l'état des émulsions a été établie à différents

intervalles de temps par inspection à l'oeil nu.

Les résultats de ces expériences sont repris dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Stabilité de différentes émulsions de différentes huiles
comprenant des SLP en une concentration finale de 1 % (p/v) SLP, 2 %
5 (v/v) TWEEN 80, 10 % (v/v) d'huile dans du PBS.

Adjuvant [mg SLP+ μ l huile]/ml	Stabilité à 37 °C au jour :										
	1	2	7	10	14	21	28	35	46	53	115
SL-Maldex15/S/W [10/100]	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	±/+
SL-Cyclodex./S/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±/+
SL-Inuline/S/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+
SL-Pullulane/S/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	--
SL-Maldex15/soja/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SL-Cyclodex./soja/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SL-Inuline/soja/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SL-Pullulane/soja/W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SL-Maldex15/hexadéc./W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SL-Cyclodex./hexadéc./ W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
SL-Inuline/hexadéc./W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
SL-Pullulane/hexadéc./W [10/100]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Maldex15 = Maltodextrine15

Cyclodex. = cyclodextrine

soja = huile de soja

hexadéc. = hexadécane

- 20 -

- S = squalane
W = eau (water)
-- = deux phases; phase huileuse et phase aqueuse transparente
- = deux phases; phase huileuse et phase aqueuse blanche
5 ± = petites gouttelettes d'huile sur la phase aqueuse visible à l'oeil nu
+ = émulsion homogène blanche, pas de gouttelettes d'huiles visibles à l'oeil nu
±/+ = entre "±" et "+"
10 Les nouveaux SLP (SL-Pullulane, SL-Inuline, SL-Maltodextrine15, et SL-Cyclodextrine) incorporés dans ces émulsions d'huile de squalane, d'hexadécane ou d'huile de soja sont d'une stabilité remarquable. Les émulsions de SL-Inuline, SL-Cyclodextrine et SL-Maltodextrine15 dans du squalane sont restées stables plus de 53 jours à 37 °C. Ceci est considéré
15 comme étant une amélioration importante en comparaison avec les émulsions de SL-Ficoll/squalane/eau. En dépit de la valeur prédictive limitée du test de stabilité à 37 °C, celle-ci montre une résistance accrue contre les facteurs de déstabilisation.
20 Toutes les émulsions, à l'exception de SL-Pullulane/squalane/eau, sont restées stables pendant au moins 53 jours à 37 °C. Après 115 jours, la plupart des émulsions comprenant SL-Maltodextrine15, SL-Cyclodextrine et SL-Inuline sont restées stables, bien que des émulsions avec du squalane et de l'hexadécane montraient quelques gouttelettes d'huile sur l'émulsion.

REVENDICATIONS

- 1 - Adjuvant pour vaccins comprenant un polysaccharide sulfo-lipidique combiné à un composant formant une interface.
- 5 2 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est un polysaccharide hydrophobe.
- 3 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est choisi parmi le groupe constitué de cyclodextrine, maltodextrine, inuline, ficoll et pullulane.
- 10 4 - L'adjuvant selon la revendication 3, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est une cyclodextrine.
- 5 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 0,01 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.
- 15 6 - L'adjuvant selon la revendication 5, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 0,12 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.
- 20 7 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 1,0 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.
- 8 - L'adjuvant selon la revendication 7, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 0,23 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.
- 25 9 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de la maltodextrine et contient en moyenne environ 0,23 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.
- 10 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le

polysaccharide sulfo-lipidique est de la cyclodextrine et contient en moyenne environ 0,20 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

5 11 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de l'inuline et contient en moyenne environ 0,19 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

10 12 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est du pullulane et contient en moyenne environ 0,16 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

15 13 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est du ficoll et contient en moyenne environ 0,12 groupe sulfate par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

14 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 0,01 groupe lipidique par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

20 15 - L'adjuvant selon la revendication 14, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique contient en moyenne au moins 1,05 groupe lipidique par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

25 16 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 2,0 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

17 - L'adjuvant selon la revendication 16, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique ne contient en moyenne pas plus de 1,29 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

30 18 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de la maltodextrine contenant en moyenne

environ 1,29 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

19 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de la cyclodextrine contenant en moyenne
5 environ 1,05 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

20 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de l'inuline contenant en moyenne environ
10 1,24 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

21 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est du pullulane contenant en moyenne environ 1,24 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

15 22 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est du ficoll contenant en moyenne environ 1,22 groupes lipidiques par monosaccharide, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

20 23 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que les groupes lipidiques comprennent de 4 à 22 atomes de carbone.

24 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rapport des groupes sulfates et lipidiques est compris entre 0,01 et 2 groupes sulfates par groupe lipidique, tout en maintenant le caractère hydrophobe du composé.

25 25 - L'adjuvant selon la revendication 24, caractérisé en ce que le rapport des groupes sulfates et lipidiques est compris entre 0,10 et 0,19 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant le caractère hydrophobe du composé.

30 26 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de la maltodextrine contenant un rapport des groupes sulfates et lipidiques d'environ 0,18 groupe sulfate par groupe

lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

- 5 27 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de la cyclodextrine contenant un rapport des groupes sulfates et lipidiques d'environ 0,19 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

28 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est de l'inuline contenant un rapport des groupes sulfates et lipidiques d'environ 0,15 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

- 10 29 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est du pullulane contenant un rapport des groupes sulfates et lipidiques d'environ 0,13 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

- 15 30 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polysaccharide sulfo-lipidique est du ficoll contenant un rapport des groupes sulfates et lipidiques d'environ 0,10 groupe sulfate par groupe lipidique, tout en maintenant son caractère hydrophobe.

- 20 31 - L'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composant formant une interface est choisi parmi le groupe constitué d'un liquide non miscibles à l'eau et un solide insoluble dans la phase aqueuse.

32 - L'adjuvant selon la revendication 31, caractérisé en ce que le liquide non miscible à l'eau est choisi parmi le groupe constitué de squalane, huile de soja, huile minérale et hexadécane.

- 25 33 - Utilisation d'un polysaccharide sulfo-lipidique selon l'une quelconque des revendications 1-30 en tant qu'adjuvant dans des vaccins.

34 - Procédé pour préparer un vaccin en émulsion caractérisé en ce que l'on émulsionne une solution aqueuse d'un antigène, un polysaccharide sulfo-lipidique selon l'une quelconque des revendications 1-30, un composant formant une interface et un émulsifiant.

- 30 35 - Vaccin comprenant une quantité immunogénique d'un antigène et

- 25 -

un adjuvant comprenant un polysaccharide sulfo-lipidique selon l'une quelconque des revendications 1-30 et un composant formant une interface.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/BE 95/00119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JAPAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 58, no. 3, pages 145-151, MIZUMOTO K. ET AL. 'Sulfated Homopolysaccharides with Immunomodulating Activities are More Potent Anti-HTLV-III Agents than Sulfated Heteropolysaccharides' see the whole document ---	1-35
X	IMMUNOLOGY, vol. 60, no. 1, OXFORD, pages 141-146, HILGERS L.A.T., ET AL 'Synthetic sulphopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immune responses' see the whole document ---	1-35
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 April 1996

Date of mailing of the international search report

23.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte nal Application No
PCT/BE 95/00119

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 549 074 (DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH) 30 June 1993 cited in the application see the whole document ---	1-35
A	VACCINE, vol. 12, no. 7, GUILDFORD GB, pages 653-660, HILGERS L., ET AL. 'A novel non-mineral oil-based adjuvant. I.' cited in the application see the whole document -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 95/00119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-549074	30-06-93	AU-B- 659899	01-06-95
		AU-B- 3038292	24-06-93
		CA-A- 2085827	24-06-93
		CN-A- 1074135	14-07-93
		JP-A- 5255117	05-10-93
		ZA-A- 9209870	18-08-93
